UNIVERSITÉ D'ALGER
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
ANNÉE 1949 N° 1

CONTRIBUTION AU DOSAGE NÉPHÉLÉMÉTRIQUE DES PROTEINES ET DE LEURS FRACTIONS

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université : Mention Pharmarcie

présentée et soutenue publiquement le 10 Mars 1949

par

M. Charbit Georges

né le 5 Octobre 1911 à Sidi-Bel-Abbès (Dép. d'Oran)

MEMBRES DU JURY

MM. PORTES, *Professeur*		Président
MONNET, *Professeur*, ...		Juges
CHECHAN, *Agrégé*, ...		Juges
GRANGAUD, *Agrégé*, ...		Juges

IMPRIMERIE MODERNE — TLEMCEN

1949

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41542710_0074

UNIVERSITÉ D'ALGER
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
ANNÉE 1949 N° 1

CONTRIBUTION AU DOSAGE NÉPHÉLÉMÉTRIQUE DES PROTEINES ET DE LEURS FRACTIONS

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université : Mention Pharmarcie

présentée et soutenue publiquement le 10 Mars 1949

par

M. Chazbit Georges

né le 5 Octobre 1911 à Sidi-Bel-Abbès (Dép. d'Oran)

MEMBRES DU JURY

MM.	PORTES, *Professeur*	Président
	MONNET, *Professeur*, ...	Juges
	CHECHAN, *Agrégé*, ...	
	GRANGAUD, *Agrégé*, ...	

IMPRIMERIE MODERNE — TLEMCEN

UNIVERSITE D'ALGER

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE D'ALGER

Doyens . . . . . MM. SARROUY
LEBLANC

Doyens honoraires . . . . . GILLOT
MUSSO

Assesseur . . . . . N...

PROFESSEURS

Clinique d'oto-rhino-laryngologie . . .	MM. N...
Clinique médicale	AUBRY
Clinique des maladies infectieuses . . .	BENHAMOU
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie.	LOMBARD
Clinique chirurgicale	COSTANTINI
Bactériologie	FABIANI
Matière médicale	FOURMENT
Chemie biologique et médicale	GIBERTON
Histologie et embryologie	KEHL
Hygiène, hydrologie et climatologie . . .	LACROIX
Clinique obstétricale et gynécologique . .	LAFFONT
Clinique thérapeutique médicale . . .	LEBON
Physiologie	MALMEJAC
Clinique psychiatrique	MANCEAUX
Parasitologie et zoologie médicale . . .	MANDOUL
Pharmacie	MONNET
Anatomie pathologique et oncologie humaine	MONTPELLIER
Physique médicale	PORTES
Clinique des maladies des pays chauds et des maladies syphilitiques et cutanées . .	N...
Anatomie	DE RIBET
Botanique	ROQUES
Clinique urologique.	SABADINI
Clinique médicale et hygiène infantile . .	SARROUY
Médecine légale et médecine du travail . .	THIODET
Clinique ophtalmologique et ophtalmologie intertropicale.	TOULANT
Chimie générale pharmaceutique et toxicologie	WUNSCHENDORFF
Pathologie générale et médicale . . .	RAYNAUD, Robert

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. ARGAUD
COURRIER
GILLOT
LEBLANC
MM. MUSSO
POROT
WEBER

R. UNIV
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

PROFESSEUR SANS CHAIRE

M. HOUEL — Agrégé pérennisé (obstétrique)

AGREGES

Accouchements	MM. JAHIER
Médecine	N. .
	LEVI-VALENSI
Chirurgie	GOINARD
	LIARAS
	VERGOZ
Anatomie pathologique	LAFFARGUE
Chimie medicale	GRANGAUD
Physiologie.	CHARDON
Physique médicale	CHECHAN
Bactériologie	N..
Anatomie	N...
Histoire naturelle pharmaceutique . . .	N...
Chimie générale pharmaceutique et toxicologie	N...
Pharmacie	COLLET
Dermato syphilygraph	HADIDA

AGREGE LIBRE

Physiologie . . . . . M. BATTEZ

*

Contribution au Dosage Néphélémétrique des Protéines et de leurs Fractions

*

Je dédie cette thése :

A MA MÈRE

A MON PÈRE

A MA FEMME

A MES FRÈRES ET SŒUR

A MES ONCLES

A TOUS LES MIENS

A MON PRESIDENT DE THESE

Monsieur le docteur PORTES

Professeur de Physique médicale

A qui je dois d'avoir pu dégager de l'Œuvre scientifique la leçon de haute humanité et de grande conscience qui caractérisent son enseignement.

A Monsieur le docteur CHECHAN

Professeur agrégé à la Faculté

Qui m'a guidé de ses précieux conseils tout au long de mon travail et à qui j'exprime toute ma reconnaissance.

A MES JUGES

A MES MAITRES

PRÉAMBULE

Le dosage des protéines et de leurs fractions constitue un des problèmes à l'ordre du jour de la biochimie. L'abondance et l'autorité des publications qui paraissent depuis ces dernières années sur ce sujet dans la presse spécialisée de tous les pays suffit à le prouver.

Si l'on procède à un simple examen d'ensemble de la question, on ne peut manquer d'être frappé d'une part de la multiplicité des techniques proposées et de la diversité des principes qui les inspirent, et d'autre part de la longueur, sinon de la difficulté des manipulations à effectuer, au moins en ce qui concerne les méthodes unanimement considérées comme valables Ces inconvénients d'ordre à la fois théorique et pratique n'ont certes pas échappé aux auteurs. Ainsi un effort semble-t-il avoir été fait, dans les plus récents travaux dans le sens de plus de simplicité et de plus de rapidité.

C'est précisément dans ce cadre que vient s'inscrire notre contribution au dosage néphélémétrique des protéines et c'est pourquoi il convient de signaler ici le caractére avant tout pratique des préoccupations qui ont guidé notre travail et qui sont le souci constant de tous les biologistes praticiens, à savoir, rapidité des manipulations et precision des résultats deux éléments qui commandent la généralité de notre activité au laboratoire et plus particuliérement le choix des procédés de dosage en chimie biologique.

Nous nous sommes adressés à la néphélémétrie parce qu'elle nous semblait à priori apporter à la solution de ce probléme les avantages d'une mesure rapide. Pour cette raison essentielle, l'appréciation de l'intensité des troubles jouit de la grande faveur des biologistes depuis qu'à l'évaluation évidemment grossiére à l'œil a succédé la mesure véritable au moyen de photométres visuels et photo-électriques.

Ces derniers appareils ayant fait leurs preuves de commodité et de précision dans la mesure des solutions colorées, la néphélémétrie prétendait aux mêmes avantages. Son utilisation devint alors de plus en plus étendue et l'on peut dire que chaque fois que la production quantitative d'un trouble au sein d'un liquide intervenait dans une réaction. celle-ci fut sollicitée aux fins de dosage. L'on a pu assister à une floraison de techniques aux fortunes les plus diverses, parmi lesquelles notamment divers procédés de détermination des protides et de leurs fractions dans les liquides biologiques.

Le fond de notre exposé sera donc constitué par l'étude critique de ces procédés à la lumiére des lois de la photométrie des milieux troubles puis la description de la technique que nous avons mise au point et sa justification par rapport à ces mêmes lois et en regard des méthodes éprouvées.

Il sera cependant précédé, d'une revue des méthodes physiques, chimiques et colorimétriques, dans laquelle ne seront retenues et étudiées plus spécialement que celles qui répondent au critére majeur pour les praticiens de la simplicité et de la rapidité.

CHAPITRE I

Les techniques que nous étudierons ici se divisent en :

1) **Méthodes physiques**
2) **Méthodes colorimétriques**
3) **Méthodes chimiques**

1. — Méthodes physiques.

Les méthodes physiques comprennent :

la réfractométrie
la densimétrie

A) REFRACTOMÉTRIE

La mesure de l'indice de réfraction a été utilisée en vue de l'appréciation des protéines du sérum sanguin : cet indice augmente proportionnellement à la concentration en protides. La détermination se fait en lumière monochromatique avec un réfractomètre type Féry ou Pulfrich à cuve de capacité importante (5cc,) ou avec l'appareil d'Abbe qui n'exige que 2 gouttes de sérum.

Reiss a publié des tables de calculs qu'il a établies en faisant intervenir des coefficients de correction pour les composés non protéiques et une moyenne pour les indices différents de l'albumine et de la globuline.

Ces cœfficients ont donné lieu à des critiques ; le facteur 0,00172 pour les albumines serait un peu faible et le coefficient de correction pour les composés non protéiques un peu fort. Ainsi rectifiée, la technique de Reiss donnerait des résultats exacts à 5 pour 1.000 près.

Cette méthode élégante et pratique présente cependant des causes d'erreur importantes qui reposent essentiellement sur la pré-

sence dans le sérum de substances réfringentes à teneur très variable ; ce sont les lipides. Tant que ceux-ci se trouvent dans les limites normales l'erreur est négligable, mais lorsqu'ils augmentent elle devient considérable.

L'urée du sang a des incidences semblables mais plus atténuées.

Enfin le fait même de la définition d'un coefficient moyen entre albumine et globuline désigne le défaut de la méthode quand le rapport sérine-globuline se trouve sérieusement perturbé.

A titre d'exemple, voici quelques comparaisons de mesures extraites d'un tableau que nous empruntons à MM. Traverse et de Praitère. *(1)*

Lipides	Protides	Réfractométrie
3,8	74,9	80,6
6,3	75,8	83,7
6,4	77,6	82,8
8,2	58,6	66,6
12	71	81
19,4	39,9	56,8
23,1	55,4	86

Urée	Lipides	Protides	Réfractométrie
4,35	8,8	61,4	76,9
5,16	11,2	63,8	79,5

B) DENSIMETRIE

L'idée de déduire la teneur en protides du sérum de son poids spécifique est élémentaire et a été utilisée depuis longtemps.

La méthode a l'avantage de n'exiger que des petites quantités de sérum : 0 cc. 2 à 0 cc. 5 et d'être valable quelle que soit la valeur du rapport sérine-globuline.

Nous ne ferons que mentionner les méthodes cinétiques qui déduisent de la vitesse de chute le taux des protides. L'évaluation de la durée de chute se fait dans un tube spécial entre deux repères situés à bonne distance l'un de l'autre (50-60 cm.). La goutte calibrée de sérum tombe dans un liquide de densité connue non miscible au sérum et l'on note au 1/5e de seconde près son passage devant chaque repère.

Le calcul se fait par référence à des solutions-étalons de sulfate de potassium rigoureusement titrées.

Cette technique présentée recemment par Polonowsky et Nordam (2) paraît à première vue très simple. Mais elle a l'incon-

vénient à notre sens de nécessiter un appareillage assez compliqué et des produits chimiques difficiles à trouver à l'état de pureté requis.

Nous allons examiner en détail la méthode dite au " sulfate de cuivre " de Van Slyke et Philips (3), particulièrement en honneur aux Etats-Unis depuis son emploi courant dans les laboratoires de campagne de l'Armée américaine pendant la dernière guerre en raison de sa rapidité.

C'est une méthode statique ; elle consiste à déterminer la position d'équilibre des gouttes de dimensions variables au sein d'un liquide.

Le principe consiste à faire tomber des gouttes de sérum dans des solutions de sulfate de cuivre de densités croissantes et exactement définies Une fois la densité du sérum déterminée une équation permet le calcul du taux des protéines totales par litre.

Dans la pratique, dans chacun des flacons de solutions cuivriques, on laisse tomber d'une pipette, une goutte de sérum ou de plasma. Lorsque le sérum est plus lourd que la solution à essayer la goutte tombe au fond du tube aprés un arrêt trés court. S'il est plus léger, elle tombe également après un arrêt suivi d'une légére remontée. A densité égale il y a arrêt plus prolongé sans remontée.

Il faut noter que le sérum ne risque pas de se mélanger à la solution, une mince pellicule produite par le contact enrobant la goutte de sérum sans en altérer le poids spécifique pendant le temps nécessaire, 15 à 20 secondes à la lecture du phénomène. Après quelques essais, un manipulateur ayant un peu d'habitude saisit assez rapidement le phénomène d'iso-densité recherché.

Il faut reconnaitre qu'il est difficile de concevoir technique d'exécution plus simple, plus rapide et nécessitant un matériel aussi restreint.

Nous l'avons pratiquée de façon très suivie et nous avons dû constater qu'il n'est pas très aisé de saisir de manière non discutable l'arrêt franc de la goutte au sein du liquide.

A ce reproche d'ordre pratique s'ajoutent des considérations beaucoup plus sérieuses au sujet de l'équation proposé par Van Slyke.

Celle-ci s'exprime ainsi :

Protéines $= 343 \times (d = 1{,}0070)$

Le facteur de correction 1,0070 étant le poids spécifique moyen de l'ultra-filtrat sanguin. La constante 343 établie par l'expérience a été ensuite corrigée par ses auteurs et remplacée par 360 en utilisant comme méthode référence la Kjeldahlisation. Signalons dès

maintenant que l'exactitude de cette constante va dépendre de la valeur de la méthode de Kjeldhal. Si bien que ces deux éléments du calcul ont continué à subir des modifications qui les ont portées respectivement à 347,9 et 1,0071 puis à 389 et 1,0072 pour être arrêtés à 390 et 1,0074.

Discussion des Méthodes Physiques :

Une première critique d'ordre théorique paraît évidente : les déterminations ne visent de toute façon que des propriétés physiques du sérum ou de solutions aqueuses pures de protéines étroitement liées il est vrai, à leur teneur en protides. Mais, surtout dans les liquides pathologiques, et ce sont ceux-là dont l'étude est la plus intéressante interviennent des composés non protidiques qui faussent plus ou moins les résultats : les lipides dans les mesures réfractométriques, les autres éléments (urée, glucose, etc.) dans les mesures densimétriques.

De plus, et bien que certains essais aient été tentés dans ce sens qui sont encore à l'étude, ces techniques ne peuvent servir qu'au dosage des seuls protides totaux et non de leur fractions, albumine et globulines.

Enfin leur champ d'application est restreint ; sérum sanguin, à la rigueur liquides de ponction /ascite, plèvre/, mais ne s'étend pas aux liquides céphalorachidiens, urines. Cette espèce de polyvalence est encore une des qualités que le chimiste demande à toute méthode de dosage des protéines.

N.-B.- Signalons pour mémoire une propriété des sérums : la pression osmotique, qui se trouve également dans un rapport direct avec la concentration en protéines, mais qui ne peut servir à un véritable dosage, tout en étant intéressante en ce qui concerne le quotient albumineux.

2. — *Méthodes colorimétriques.*

Ces méthodes ne sont pas à proprement parler purement physiques, puisqu'elles utilisent des réactions colorées entre protides ou constituants des protides et certains réactifs, mais nous les classons dans cette rubrique par commodité, parce que l'intensité de ces réactions est finalement évaluée par un procédé physique : au colorimétre de Duboscq ou mieux à l'électro-photomètre.

Elles ont retenu notre attention, car elles offrent l'avantage — que nous n'avons pas reconnu aux précédentes méthodes — d'un dosage séparé de l'albumine et de la globuline.

A) Techniques utilisant la réaction à la tyrosine :

Ce sont les techniques de H. Wu (4) et similaires.
Elles sont basées sur la réaction que donne l'acide phosphomolybdo-tungstique (réactif de Folin-Wu) avec les phénols, en particulier avec la tyrosine, l'étalon servant à la comparaison colorimétrique étant préparé avec de la tyrosine pure. Nous les citons pour mémoire, car elles représentent un effort appréciable pour rendre le dosage des protéines plus rapide.

Sans entrer dans les détails, rappelons qu'après la séparation par le sulfate d'ammonium à demi-saturation, les précipités d'albumine et de globuline sont solubilisés puis reprécipités par l'acide tungstique pour purification, remis en solution dans le carbonate de sodium pour préparation de la réaction colorée que l'on appréciera au photomètre. Le calcul est facile à faire : 1 Mgr de tyrosine correspondant à 27, Mgr 5 d'albumine et 25, Mgr 2 de globuline.

Cette technique demeure néanmoins encore longue et les manipulations, si elles restent simples, sont encore trop nombreuses.
En outre, et c'est une critique plus sérieuse, elle fait intervenir dans le calcul des coefficients que rien ne nous autorise à tenir pour absolus, pour la raison que la répartition des acides animés dans le sérum est sujette à des fluctuations qui risquent d'avoir des incidences fâcheuses sur la réaction, donc sur les résultats.
Enfin, la méthode n'a de rigueur que dans le dosage séparé des protides et oblige le chimiste à exécuter une double série d'opérations quand celui-ci n'a en vue que le dosage global des protéines.

B) Techniques utilisant la réaction du buret :

Des auteurs américains : Kingsley, puis Hower, Robinson et Hoglen (5) et enfin Weichselbaum (6) l'ont employée avec de petites variantes. C'est la dernière que nous retiendrons, séduits par sa simplicité. Servantie est cité comme l'ayant expérimentée en France. Nous l'avons personnellement éprouvée, suivant la description donnée par Paget (7).

Les réactifs nécessaires sont :

Réactif du biuret ;

Solution urée-thymol ;

Solution de sulfate de sodium anhydre à 23 p. 100, éther, et trois solutions-étalons de protéine préalablement titrées ;

un étalon fort, un moyen et un faible.

La technique se prête aussi bien au dosage des protéines totales qu'au dosage de l'albumine seule, la différence fournissant le chiffre des globulines.

Mode opératoire :

1°) Protéines totales : dans un tube à essai, on mesure :
0cc.2 de sérum,
4cc.8 de solution d'urée,
5cc. de réactif de biuret.

Après une 1/2 heure, lecture au colorimètre de Hellige-Duboscq.

2e) Albumine : dans un tube à essai, on met :
0cc.5 de sérum,
7cc.5 de solution de sulfate de sodium pour séparer la globuline,
3cc. éther.

On agite fortement le mélange — après avoir bouché le tube avec un bouchon de caoutchouc — pendant 30 secondes. On centrifuge à bonne vitesse. On a alors dans le tube 3 couches ;

1re couche superficielle ayant entraîné les lipides : éther ;

2e couche : une pastille des globulines précipitées ;

3e couche : un liquide limpide contenant la sérum-albumine.

On incline lentement le tube pour décoller des parois la pastille et, en évitant de la désagréger, on prélève à la pipette 5 cc de solution claire. A ces 5 cc on ajoute 5 cc de réactif du biuret, etc.

Nous donnons in extenso les détails de ces opérations parce qu'ils nous ont fourni un tournemain très commode pour la séparation facile des protéines, que nous avons adopté dans notre technique.

Une formule donne les chiffres recherchés.

Il est évident qu'on peut substituer au colorimètre visuel un électro-photomètre, suivant les indications de Hogden (5) en faisant la lecture entre 560 et 700 mm. La méthode répond bien aux exigences de simplicité et de rapidité que nous nous sommes fixées comme règle d'or dans la recherche d'une solution pratique au dosage des protéines. Mais malheureusement, la rapidité nous semble ici obtenue aux dépens de la précision. D'une part, nous avons pu observer que la réaction du Biuret ne donne pas des teintes constantes pour des sérums différents, surtout pour des teneurs faibles en protéines par litre. D'autre part, Servantie et nous-mêmes avons pu conclure que les variations par rapport à la méthode pondérale sont au moins de 5 %, marge d'erreur déjà importante et peu compatible avec l'exigence d'un minimum de précision.

3) Méthodes Chimiques.

Nous ne citerons parmi les méthodes chimiques que les méthodes très connues, qui ont d'ailleurs été utilisées par tous les auteurs pour étalonner leurs techniques et par suite à en définir le degré de précision.

Elles sont de deux ordres ;

A) Gravimétriques
B) Titrimétriques

Nous nous bornerons à en indiquer les principes.

A) Gravimétrie.

a) Protéines totales : elles sont précipitées à froid par l'alcool, l'acétone, des mélanges acétone-alcool (qui dans le même temps délipoïdent le sérum), l'alcool méthylique, l'acide trichloracétique, le méthylal. Les précipités sont soigneusement désséchés puis pesés.

b) Dosage séparé de l'albumine et de globuline : ces fractions sont séparées par divers réactifs : Van Slyke, Cullen (8) et de nombreux auteurs emploient le sulfate d'ammoniun à demi-saturation, Kaiser (9) le sulfate de magnésium à saturation, Howe (10) le sulfate de soude anhydre à 22,2%. Les précipités sont lavés pour éliminer les réactifs, desséchés et pesés. Nous ne décrirons pas le détail des opérations qui demandent à être exécutées par un praticien averti : elles sont longues, multiples et délicates et, de ce fait, risquent d'entrainer des pertes de substance préjudiciables au résultat final. De plus elles exigent des quantités de liquide importantes allant au minimum de 2 à 5 cc.

Ces inconvénients rendent ces techniques peu praticables, surtout dans les laboratoires cliniques.

B) Titrimétrie.

Ces méthodes sont toutes basées sur le procédé azotométrique de Kjeldahl Les plus usitées sont celles de Howe et Piettre et Villa.

Après séparation par les réactifs usuels, les précipités sont minéralisés et on dose l'azote par la méthode de Kjeldahl (entrainement de l'ammoniaque formée par la vapeur d'eau dans une quantité connue d'une solution titrée d'acide sulfurique et titrage par retour). Les chiffres d'azote trouvés sont convertis en protéines à l'aide de coefficients :

pour l'albumine : Piettre et Villa donnent 6,58 — 6, 62
Guillaumin 6,55.

pour la globuline : Piettre et Villa donnent 6,95, d'autres jusqu'à 6,25.

Ces techniques ont l'avantage sur les méthodes pondérales de n'exiger que des prises d'essai relativement petites : Occ. 5 et de raccourcir la durée des opérations. Mais elles demeurent encore longues. Elles sont tenues généralement pour précises, encore que les résultats soient régulièrement un peu élevés par rapport à la méthode gravimétrique.

Elles appellent néanmoins un certain nombre de réserves : D'abord, les coefficients de transformation de l'azote en protéines n'ont pas la même valeur pour tous les auteurs : ils varient, nous l'avons vu, dans des limites assez larges. D'où résultent des écarts dans la transcription des résultats, faibles pour les chiffres d'albumine, plus importants pour les globulines, de sorte que l'établissement du rapport sérine-globuline comporte une incertitude relative. Aussi Howe préfère-t-il exprimer le résultat en azote.

En outre, la méthode est essentiellement destinée au dosage séparé des fractions protidiques : complication superflue s'il s'agit seulement de déterminer les protides totaux. A moins qu'à ce moment, l'on ne fasse jouer dans le calcul un coefficient moyen, encore sujet à discussion, et soumis d'autre part aux fluctuations du quotient albumineux.

Enfin, la diversité des réactifs de séparation fait que les résultats obtenus par les diverses techniques ne sont absolument plus comparables. En effet, alors que les globulines ont été définies à l'origine comme la fraction protidique du sérum qui précipite en totalité dans un milieu saturé au demi par le sulfate d'ammonium à un pH défini, on a utilisé d'autres sels, notamment le sulfate et le sulfite de sodium dont les effets sont très différents : le premier et encore plus le second laissent en solution certaines fractions globuliniques et conduisent à des taux d'albumine nettement élevés.

Pour toutes ces raisons, la méthode de référence la plus sûre, parce que la plus directe demeure la méthode pondérale, qui nous a d'ailleurs servi d'étalon.

CHAPITRE II

1. — Méthodes néphélémétriques

Avant d'aborder l'étude des méthodes néphélémétriques, il convient de mentionner les lois qui régissent la photométrie des milieux troubles, les procédés employés (diffusimétrie et opacimétrie) et les appareils les plus usités actuellement.

a) *Loi de Rayleigh* : C'est la loi fondamentale.

Sans entrer dans le détail de l'équation qui l'exprime, on peut dire qu'elle définit la valeur de l'intensité du flux lumineux diffusé par des particules solides en suspension dans un milieu liquide par rapport :

— au flux lumineux incident,
— au nombre de particules non colorées,
— à la longueur d'onde de la lumière utilisée,
— au volume total de matière en suspension.

Dognon (16) en a donné une analyse très claire et détaillée. cette loi implique un rapport de proportionnalité directe entre la Concentration en particules suspendues et le flux diffusé, qui n'est valable que pour certaines dimensions des grains : de diamètre inférieur à $\frac{\lambda}{2\pi}$ (λ étant la longueur d'onde de la lumière utilisée), cessant de l'être pour les grains de dimensions superieures.

C'est ainsi que le flux lumineux absorbé croît d'abord avec la grosseur des grains, passe par un maximum puis diminue.

Conséquences pratiques : Si l'on veut donc pratiquer la néphélémétrie d'une manière valable ou autrement dit obtenir des courbes de floculation régulières, il faut :

1° s'assurer d'une taille donnée des grains dans la marge des grandeurs inférieures à la limite précédemment définie et

de la constance de cette taille à toutes les concentrations à mesurer.

2e que la concentration en particules suspendues ne soit pas trop forte de manière à ce que les densités optiques restent au-dessous d'une certaine limite (90 à 100 degrés Vernes).

b) *Procédés néphélémétriques :*

La lecture de l'intensité d'un trouble peut se faire de deux manières :

— ou bien on estime l'affaiblissement de la lumière qui traverse le milieu : c'est l'opacimétrie,

— ou bien on estime la lumière diffusée par phénomène de Tyndall : c'est la diffusimétrie.

Ces deux procédés présentent des mérites et défauts que nous allons signaler brièvement.

a) *Diffusimétrie*

Avantages : L'intensité de la lumière diffusée dépend essentiellement de la concentration en particules suspendues, Pour cette raison, l'erreur demeure relativement faible même si l'on opère en milieu coloré.

Inconvénients : La lumière diffusée ne représente le plus souvent qu'une fraction très faible de la lumière incidente, d'où nécessité d'un photo-récepteur sensible. L'œil vaut mieux dans ce cas que la cellule photo-électrique.

b) *Opacimétrie*

Avantages : Le flux lumineux émergeant est important : il peut donc être mesuré avec précision par un récepteur impersonnel (cellule photo-électrique, pile thermo-électrique...)

Inconvénients : L'opacimétrie est évidemment moins spécifique que la diffusimétrie car la couleur du milieu peut intervenir (Sérums très colorés).

On peut pallier ces inconvénients par le choix d'une lumière incidente convenablement filtrée. Le filtre ne doit pas couper trop haut car l'absorption par un milieu trouble décroît quand il augmente, ni trop bas car la coloration du sérum normal fait sentir son influence, surtout au-dessous de 5.000 millimicrons. C'est pourquoi l'écran rouge (Wratten 27) a été unanimement choisi pour la pratique de l'opacimétrie avec tous les électro-photomètres. D'autre

part, pour la question qui nous occupe, la couleur du sérum n'interviendra pratiquement pas, puisque les mesures se feront sur des liquides dilués au 1/200e.

c.- *Appareils utilisés.*

Ils appartiennent à deux catégories :

— Appareils à observation visuelle ;
— Appareils photo-électriques.

a) Appareils à observation visuelle.

1°) le colorimètre de Dubosq a été équipé d'un dispositif qui permet l'opacimétrie. On ne peut en attendre dans ce cas plus de précision que dans les mesures colorimétriques et l'on sait que celle-ci est très relative.

2°) Bien plus employés, et à juste titre, sont les photomètres du type Vernes à coin photométrique ou du type Pulfrich à diaphragme photométrique. Ce dernier permet également la diffusimétrie et l'opacimétrie.

Nous avons pu, grâce à l'obligeance de Monsieur le Professeur Chéchan, effectuer au Centre de recherches physico-chimiques dirigé par Monsieur le Professeur Portes, des mesures de colorimétrie et d'opacimétrie au Pulfrich avec toute la précision et la fidélité désirables. Nous nous sommes rendus compte que, malgré la lecture à l'œil nu, le coefficient personnel joue très peu.

b) Appareils photo-électriques.

1°) En opacimétrie, le colorimètre d'Evelyn est utilisable. Nous avons pu le voir fonctionner également au Centre de recherches.

Il est de construction très simple : une source lumineuse, une cuve (un tube calibré suffit), une seule cellule. On lit la division galvanométrique D et on se reporte à une courbe d'étalonnage : $D=f\ /c/$, qui n'est pas une droite.

2°) L'appareil de Meunier est construit avec deux cellules montées en opposition, avec coin photométrique. Bien qu'utilisant une méthode de zéro, il est nécessaire de faire deux lectures successives : solvant, puis solution.

3°) L'appareil de Bonnet-Maury basé sur le même principe (2 cellules en opposition, méthode de zéro) dans lequel on substitue à l'absorption inconnue une absorption réglable de valeur connue produite par la rotation rapide d'une palette métallique de profil spécial sur le parcours du faisceau lumineux L'absorption dûe à cette palette est indépendante de sa vitesse de rotation et de la lon-

gueur d'onde ou de la polarisation de la lumière utilisée. Elle dépend seulement de sa position par rapport au faisceau lumineux intercepté.

La densité optique de ce système est définie mécaniquement et est déterminée *en valeur absolue* avec une très grande précision.

L'appareil est livré pour fonctionner sur le secteur-ville, muni d'une boîte d'alimention destinée à stabiliser le courant. Néanmoins nous avons constaté que ce palliatif était encore insuffisant : les variations du secteur sont certes très atténuées mais non pas supprimées. Sur la suggestion ce Monsieur le Professeur Chéchan, nous avons pris le parti d'alimenter notre appareil avec une batterie de 6 volts qui débite évidemment un courant rigoureusement fixe. Dans ces conditions nous avonc eu toute satisfaction au point de vue de la précision et de la fidélité des mesures.

2. — *Méthodes néphélémétriques appliquées au dosage des protéines*

Les méthodes connues jusqu'ici méritent-elles de prendre rang parmi les méthodes valables de dosage des protéines ? C'est ce que nous allons examiner en regard de leurs résultats expérimentaux et à la lumière de la loi de Rayleigh.

Ces méthodes diffèrent seulement par le choix du réactif précipitant.

a) Méthode à l'acide trichloracétique :

Traditionnellement employée depuis Mestrezat pour le dosage de l'albumine du liquide céphalo-rachidien et pouvant s'appliquer à d'autres solutions protéiniques convenablement diluées (sérum sanguin, liquides de ponction), elle ne présente à l'heure actuelle qu'un intérêt historique ; et ne peut prétendre qu'à donner au clinicien des indications grossières.

Laborde (12), en opérant en diffusimétrie, a pu démontrer l'excellence de l'acide trichloracétique comme réactif de précipitation quantitative des protéines, à une concentration définie (solution de densité 1,146 à 30 gr. pour 100 cc. de volume total). Nous avons confirmé pour notre part ce point de vue, mais il ne nous a pas été donné d'obtenir des résultats d'une précision suffisante : la précipitation se fait en gros grains, s'agglomérant très rapidement en gros flacons difficiles à homogénéiser ; ce qui rend imposible toute éventualité fine du trouble, que l'on utilise des gammes étalon ou la photométrie.

b) Méthode d'Ujsaghi (13) : Elle comporte deux temps :

1. — Dosage des protides totaux ;

A un cc. de solution à doser, on ajoute 3 cc. du réactif suivant :

Solution saturée de sulfate d'ammonium préparée à chaud et neutralisée	2 vol.
Acide chlorhydrique 0, 4 N	1 vol.

Après 15 minutes, mesure au photomètre de Pulfrich.

2. — Dosage des globulines :

Elles sont précipitées par le sulfate d'ammonium saturé et neutre : 1 volume de réactif pour un volume de solution, pour faire la demi-saturation du milieu. Après 15 minutes, lecture.

c) Méthode de Dos Reis (14).

Elle ne diffère de la précédente que par l'emploi pour la précipitation des protides totaux seulement, d'acide sulfosalicylique à 5 %.

Pour le calcul des résultats, ces deux auteurs se réfèrent à des courbes construites à partir de solutions étalons de sérum sanguin : l'une pour les protides totaux, l'autre pour les globulines.

d) Méthode à l'acide nitrique.

Danet et Laisné (15) dosent les protéines totales par précipitation par l'acide nitrique pur et à froid de solutions dont la teneur est comprise entre 0 gr. 10 et 0 gr. 50 pour mille, soit :

Liquide pur ou dilué à l'eau physiologique	5 cc
Acide nitrique pur	0 cc 5

Après vingt minutes, agitation et lecture au photo-colorimètre avec écran rouge.

L'étalonnage se fait au moyen de mélange de sérums normaux ou mieux de liquide d'ascite ou de pleurésie séro-fibrineuse de titres déterminés par gravimétrie.

Si cette méthode convient bien à l'urine, au LCR, aux liquides pleuraux et ascitiques pauvres en lipides, il est préférable, de l'aveu des auteurs, de ne pas l'appliquer aux sérums, en raison de leurs taux variables en cénapses lipidoprotidiques qui s'opposent à la précipitation totale à froid par l'acide nitrique. Cette technique se limite au seul dosage des protéines totales, sans pouvoir être utilisée au dosage de la sérum-albumine après séparation des globulines.

Discussion générale des méthodes néphélémétriques

Nous avons essayé de façon attentive les trois dernières méthodes et nous avons été conduits à formuler un certain nombre d'observations concernant :

— les réactifs de précipitation,
— les caractéres du trouble qu'ils produisent dans le milieu étudié.

Deux facteurs qui, bien qu'en rapport direct, appellent des considérations distinctes sur la valeur des techniques proposées et qui, pour anticiper, détermineront par la suite les meilleures conditions théoriques d'une méthode néphélémétrique valable.

1°) Les réactifs

L'acide trichloracétique précipite quantitativement les protéines d'une solution, de même que l'acide nitrique à froid, mais celui-ci dans des limites déjà définies.

Quand au réactif d'Ujsaghi, il laisse en solution des quantités importantes de protides : en effet après la durée de 15 minutes prévue avant la lecture du trouble et même au-dessus les liquides soigneusement filtrés continuent à précipiter par l'acide trichloracétique ou la chaleur.

L'acide sulfosalicylique est nettement meilleur à ce point de vue mais demeure insuffisant.

2°) Caractères des troubles obtenus.

a) Protides totaux :

S'il faut rejeter délibérément l'acide trichloracétique pour les raisons déjà mentionnées à propos du procédé Mestrezat, on doit reconnaître que l'acide nitrique, le réactif d'Ujsaghi et l'acide sulfosalicylique fournissent des troubles plus fins, homogènes et non grumeleux qui paraissent devoir se prêter à de bonnes déterminations opacimétriques.

Nous nous sommes livrés à une étude approfondie de ces suspensions en nous attachant spécialement à la technique à l'acide nitrique, seul agent d'une précipitation totale. Voici nos constatations : immédiatement après l'affusion du réactif dans la solution protéinique les grains du trouble formé semblent très fins et répartis de manière homogène. Mais ils grossissent rapidement en s'agglomérant et à la 20e minute, temps optimum recommandé pour la lecture, réaction terminée), le floculat se dépose au fond du tube. Cette apparence devient d'autre part de plus en plus marquée à mesure que la concentration en protides du milieu augmente. Dès lors, l'agitation qui précède la mesure ne suffit pas à homogénéiser convenablement le trouble.

L'analyse du phénomène à l'électro-photométre, appuyée sur les nombreuses expériences que nous avons effectuées, se traduit par :

1°, l'aspect progressif de la précipitation, c'est-à-dire que l'opacité d'un trouble donné augmente avec le temps.

2°) l'irrégularité de la courbe des troubles correspondants à des concentrations protidiques régulièrement croissantes.

De sorte qu'il n'existe pas, rigoureusement parlant, de palier au niveau duquel la densité optique exprimant une opacité donnée demeure constante et qu'il devient d'autre part difficile d'établir une courbe d'étalonnage définitive et fixe.

En d'autres termes, ces suspensions se caractérisent par l'inégalité et la grande taille des agrégats constitués par les précipités, et en conséquence par une instabilité et un manque d'homogénéité qui les rendent impropres à des mesures opacimétriques d'une grande précision.

Nous devons encore ajouter que le phénomène de tassement du floculat se produit déjà à une échelle évidemment très réduite dans la cuve du photomètre et qu'il ne manque pas de se traduire au cours même de la messure par de petites variations de la densité optique perceptibles à l'œil photo-électrique.

Nous concluerons en disant que si ces techniques conviennent bien à l'évaluation des protides totaux, des LCR, des liquides de ponction, urines ou une simple approximation semble suffisante aux besoins de la clinique, elles sont moins recommandables pour le dosage précis des protéines du sang et l'établissement du rapport sérine-globuline.

b) Globulines

Le phénomène est absolument parallèle dans les techniques de dosage d'Ujsaghi et de Dos Reis des globulines par le sulfate d'ammonium à demi-saturation et toutes les remarques précédentes dont l'effet est de diminuer de façon appréciable la précision de la méthode néphélémétrique s'y appliquent également.

On ne peut manquer de regretter vivement ces inconvénients, quand l'on songe que de toutes les méthodes pratiques de dosage des protides et de leurs fractions dans les liquides organiques les plus divers, la méthode néphélémétrique était celle qui offrait au chimiste la solution élégante : la plus simple et la plus rapide.

Neanmoins, l'analyse critique que nous venons d'en faire nous aura-t-elle permis de dégager **les conditions que doit remplir une technique néphélémétrique pour satisfaire à l'exigence majeure de la précision.**

Ces conditions sont au nombre de deux :

1°) **utiliser un procédé capable de provoquer la précipitation totale des protides**

2°) **obtenir des troubles stables en cherchant à réaliser :**

a) la petite taille des grains et la constance de cette taille

b) la dispersion égale des grains dans toutes les directions de la masse liquide, autrement dit l'homogénéité durable de la suspension.

Les réaliser consiste à se placer dans le cadre de la loi de Rayleigh.

C'est d'ailleurs à la lumière de cette loi que nous avons pu comprendre l'instabilité des troubles étudiés se manifestant d'une part, lorsque le facteur temps intervient pour augmenter progressivement la taille des grains - d'emblée notable - d'autre part quand la concentration en protides s'élève dans les solutions. C'est ainsi également que nous avons pu constater que tant que les concentrations en protides se tiennent dans des taux bas (0,gr05 à 0,gr15 - 0,20 pour mille), la courbe d'étalonnage de la technique à l'acide nitrique affecte à peu près la forme d'une droite régulièrement ascendante pour prendre au dessus une allure nettement parabolique. En effet, la loi de Rayleigh montre que pour des concentrations assez faibles de la suspension, on peut négliger les effets de la diffusion secondaire et qu'à ce moment la loi de Beer-Lambert s'applique comme aux solutions colorées limpides.

On voit comment cette loi fondamentale de la photométrie rend parfaitement compte des observations empiriques que nous avons faites au sujet des incidences sur les mesures photométriques de la constitution physique des précipités et de leur concentration dans le milieu ; et de l'excellence des facteurs propres à assurer une opacimétrie précise.

Ajoutons à propos de la loi de Beer-Lambert - dont la transcription graphique est une droite - qu'elle constitue la courbe idéale vers laquelle la néphélémétrie en général doit tendre si elle veut, dans le domaine de la mesure des milieux troubles, prétendre à la précision incontestable que la colorimétrie a atteinte dans la mesure des solutions absorbantes limpides.

Nous avons tenté dans notre travail d'y parvenir.

N.B. — Expression de la loi de Beer-Lambert :

$I = I_o \cdot 10 - E\,l\,c$ ou $\log I_o = E\,l\,c$

dans laquelle I_o = intensité de la lumière incidente

I = « « émergente

l = épaisseur traversée en centimètres

c = concentration du corps absorbant

E = coefficient d'extinction

si c représente la concentration moléculaire, $E = \varepsilon$ = coefficient d'extinction moléculaire.

CHAPITRE III

TECHNIQUE NÉPHÉLÉMÉTRIQUE PERSONNELLE

1 — Dosage des Protides totaux.

La technique que nous proposons résulte de nos recherches tendant à satisfaire à la double nécessité de disposer :

a) d'un bon procédé de précipitation quantitative

b) de troubles stables et homogènes.

a) Procédé de précipitation :

C'est essentiellement pour parer à l'inconvénient du tassement du précipité protidique au sein du liquide que nous avons imaginé :

1) d'éviter la précipitation par des réactifs chimiques d'action toujours brutale, tels que les acides forts employés ;

2) de provoquer cette précipitation au sein d'un *liquide de densité élevée.*

De cette façon, pensions-nous, les particules solides seraient maintenues en suspension homogène durable.

C'est ainsi que nous avons été conduits à envisager la précipitation par la chaleur en milieu neutre - ou faiblement acide - en présence d'un électrolyte dont la concentration serait assez forte pour élever notablement la densité du liquide à étudier. Le sel qui s'adaptait parfaitement à cette condition était le sulfate de magnésium, dont la très grande solubilité dans l'eau froide fournit des solutions de densité élevée à pH neutre.

Nous avons donc commencé nos essais avec une solution aqueuse saturée à froid de sulfate Mg cristallisé pur de densité 1,28 à 15°.

Les essais préliminaires ont porté sur des solutions de protéines sanguines provenant d'un mélange de sérums normaux Nous avons fait une première dilution du sérum à l'eau physiologique suivie d'une deuxième dilution au 10' dans la solution magnésienne de façon à réaliser, dans les liquides mêmes qui serviront à l'évaluation opacimétrique, des concentrations en protides s'échelonnant de 0 gr. 10 à 0 gr. 40 pour mille au maximum. Les tubes à réaction sont alors mis au bain-marie à 100' pendant 15 minutes puis retirés et refroidis sous un courant d'eau.

b) Aspect des troubles obtenus :

A ce moment, on constate à l'œil nu que les flocons de protéines précipitées remis en suspension par une bonne agitation se dispersent dans le liquide qui se présente alors, non pas comme une suspension granuleuse à conglomérats visibles, mais comme une solution opalescente, très homogène, dans laquelle il est impossible de distinguer des grains séparés. De plus, l'émulsion reste stable et, après 24 heures de repos, elle présente encore le même aspect homogène sans aucun dépôt dans le fond du tube.

Nous avons appliqué cette méthode aux solutions de protéines d'origines les plus diverses : LCR, liquides d'ascite, pleuraux, urines, avec des résultats exactement semblables.

Ainsi, au moins quant à l'apparence et sous bénéfice d'un inventaire plus détaillé (dont il sera fait plus loin une analyse poussée lors de l'établissement de la courbe d'étalonnage), les troubles obtenus paraissent remplir les bonnes conditions déjà définies.

Restait à déterminer les possibilités de la méthode au regard de plusieurs facteurs importants :

— précipitation quantitative
— influence des lipides
— influence du pH
— rapport sérine-globuline.

1) Précipitation quantitative.

Elle l'est en effet. La réaction terminée, sur la suspension soigneusement filtrée jusqu'à obtention d'un filtrat absolument limpide, on fait la recherche des protéines par les réactifs sensibles : acide trichloracétique, réactif du biuret, réactif de Tanret. La recherche est parfaitement négative.

2) Influence des lipides.

Le taux des lipides n'a pas eu d'incidence sur les résultats, comme nous le montrerons plus loin dans la confrontation des résultats de notre méthode avec la méthode pondérale. Notamment

dans un sérum de néphrose lipoïdique, le chiffre trouvè par notre procédé était de 53 Gr alors que la pesée donnait 54 Gr, 50 pour mille.

3) Influence du pH.

Elle nous a été perceptible lorsque nous avons étudié l'influence du vieillissement des sérums ou de leurs solutions sur la valeur opacimétrique des troubles. En effet, si l'on procède à des mesures portant sur des dilutions de sérum effectuées immédiatement après le prélèvement, puis à des intervalles de huit, seize, vingt-quatre et quarante-huit heures, on constate que les densités optiques sont des chiffres régulièrement décroissants. La possibilité d'une protéolyse ou autre altération étant éliminée par la conservation du sang en glacière.

L'explication qui s'impose est que le pH du sérum fraîchement recueilli, très voisin de la neutralité : 7,3 — 7,4, tend à augmenter progressivement jusqu'à 8 par perte du CO_2 dissous. A ce moment, l'alcalinisation du milieu devient un obstacle empêchant la précipitation totale des protides par la chaleur. On peut d'ailleurs confirmer expérimentalement ce fait en modifiant dans le sens de l'alcalinité le pH d'une solution de sérum par addition ménagée de carbonate de soude. Le chiffre réel est restitué si on rétablit la neutralité.

De même si l'on veut doser l'albumine dans des urines alcalines.

En conséquence, nous avons pris le parti d'opérer à pH fixe, très faiblement acide, soit à 6,6 en ajoutant au liquide une quantité déterminée de tampon acéto-acétique de formule suivante :

acide acétique N/5	4 cc
acétate Na M/5	96 cc

4) Rapport sérine-globuline.

Il est essentiel de déterminer dans les méthodes de dosage global des protéines avant toute séparation si l'albumine et les globulines ont, à poids égaux, des actions identiques.

Nous avons vu, à propos de l'azotométrie, que les coefficients de transformation de l'azote en protéine sont sensiblement différents pour les deux constituants du sérum, et que si, pour des sérums normaux il est possible, sans sacrifier à l'exactitude, de se servir d'un coefficient moyen, pour les sérums pathologiques - et ce sont eux dont l'étude est la plus demandée et la plus intéressante - pareil artifice ne peut être employé. Cette remarque a une valeur générale.

En ce qui concerne notre technique, les vérifications que nous avons effectuées montrent que l'albumine et la globuline fournissent effectivement, à poids égaux, des réactions semblables, c'est-à-dire des opacités égales.

Nous avons donc préparé à partir d'un mélange de sérums frai préalablement étalonné par gravimétrie des solutions séparées, don titrées, d'albumine et de globulines, en utilisant la méthode clas sique de séparation au sulfate d'ammonium. Nous avons appliqu notre technique sur des dilutions croissantes et définies de ces deu liqueurs et nous avons constaté que les courbes obtenues sont su perposables, c'est-à-dire qu'à une densité optique donnée corres pond le même chiffre de sérine et de globulines.

En conclusion, quelles que soient dans une solution protéiniqu les proportions respectives de sérine et de globulines, le dosage de protéines totales effectué à l'aide de notre technique demeure va lable.

Technique arrêtée :

Sérum dilué à l'eau physiologique au 1/20e	0cc,2
Solution saturée à froid de sulfate Am	0cc,1
Tampon acéto-acétique	0cc,1
Solution sulfate Mg d = 1,28	1cc,6

N.-B. — L'addition de sulfate d'Am n'a d'autre but que d'ac centuer l'aspect opalin de la supension, ainsi que nous avons pu le remarquer en faisant le dosage de la sérum-albumine seule.

Les liquides sont mis dans l'ordre dans un tube à hémolyse que l'on bouche au bouchon de caoutchouc pour éviter la perte d'eau par évaporation. Bain-marie 100° pendant 15 minutes, refroi dissement et lecture au photo-colorimètre de Bonnet-Maury à l'écran 15 avec rallonge. Les densités optiques s'expriment en de grés Vernes.

L'aspect des suspensions obtenues rappelle celui de l'émulsion de l'antigène de Bordet-Ruelens préparée suivant une marche inversée (en versant l'antigène dans l'eau physiologique) ou à une émulsion microbienne de cocci. Au microscope, une goutte de la suspension montre des agrégats très petits, mais pas de floculats semblables à ceux que l'on rencontre dans les séro-agglutinations microscopiques positives.

Il nous semble avoir réalisé ces suspensions bleutées et non blanches dont Dognon dit qu'elles sont celles qui se prêtent le mieux à une mesure précise d'opacité.

Courbe d'étalonnage :

La courbe d'étalonnage qui nous permet de trouver pour une densité optique donnée le chiffre des protéines totales du sérum a été établie à partir d'un mélange de sérums dont le titre a été déterminé par gravimétrie.

Pour fixer la dilution finale à laquelle se feraient la précipitation puis la lecture, nous nous sommes référés à la nécessité-soulignée plus haut-d'opérer sur des concentrations en particules suspendues assez faibles, de manière à nous trouver dans le cas où la loi Beer-Lambert puisse s'appliquer. Après plusieurs essais. cette concentration correspond à une dilution au 200e dont nous avons déjà fait état par anticipation pour faciliter notre exposé.

Nous avons déterminé 14 points de la courbe s'échelonnant depuis le taux de 6 gr. 50 à 84 gr. 50 de protides totaux par litre. En portant en abcisses les chiffres de protéines et en ordonnée les D. O. correspondantes, nous obtenons le graphique dont nous donnons la reproduction (1) .Ainsi qu'on peut le voir, c'est une fonction qui suit à très peu près la loi de Beer-Lambert.

Confrontation avec les méthodes éprouvées :

La méthode qui nous a servi d'étalon : la gravimétrie, constituera la seule référence propre à juger la valeur propre à notre technique.

Voici un tableau des comparaisons que nous avons faites ;

Tubes	1	2	3	4	5	6	7	8
Gravimétrie	79	76,6	54,5	67,8	64,4	32,4	18,8	8,4
Notre technique :								
	78,2	75,5	53	66,1	63,2	33	19,2	8.7

Les sérums correspondants aux tubes 1 et 2 sont des sérums normaux

Le » » » 3 est un sérum de néphrose

Le » » » 4 « cirrhose du foie

Le tube 5 appartient à un cancer de l'estomac

Les autres sont des dilutions de sérums normaux.

On peut constater que dans cette gamme de liquides aux teneurs en protéines les plus diverses, dans les sérums pathologiques, les différences sont d'un ordre très petit qui s'expriment par un éclat relatif de 1, 5 à 3 % au plus. La concordance est donc aussi bonne qu'il est possible de le souhaiter.

Application aux autres liquides biologiques.

La technique convient, nous l'avons vu, au dosage des protéines des liquides autres que le sérum. Il suffit d'ajuster les dilutions dans les limites des concentrations en protides dans la liqueur qui servira à la mesure, limites comprises entre 0 et 0 gr. 40 pour mille. On se servira de la courbe d'étalonnage établie pour le sérum : pour le calcul, ou tiendra compte de la dilution choisie en se rappelant que cette courbe a été construite en fonction d'une dilution au 200e.

a) Lipides de ponction : ascite, plèvre, synovie :

(1) Voir graphique page 39.

La dilution finale se fera ici au 100e : à savoir une première du liquide pur à l'eau salée, puie une deuxième avec les réactifs au dixième également.

Pour la lecture des résultats sur la courbe, diviser les chiffres trouvés par 2.

b) Liquide céphalo-rachidien :

Notre procédé présénte le grande avantage de pouvoir porter sur de très petites quantités de liquides : 0 cc 3. On fait une dilution unique au quart soit :

Soit : LCR	0 cc 5	ou	0 cc 3
Sulfate Am	0 cc 1	ou	0 cc 1
Tampon	0 cc 1	ou	0 cc 1
Sulfate Mg	1 cc 3	ou	0 cc 7

Diviser les résultats par 200/4, soit par 50.

c) Urines

Même mode opératoire que pour le LCR.

Si les urines étaient très riches en albumine, on élève la dilution au I/8e ou au 16e. Pour l'expression des résultats, diviser par 200/8 ou 200/16.

Dans le cas d'urines fortement alcalines vérifier que la quantité de tempon suffit à amener le liquide au pH voulu, sinon augmenter à Occ2 ou Occ3 le volume de solution acéto-acétique.

N.B. — Il est évident que notre technique peut être parfaitement utilisée en vue de l'évaluation diaphanométrique à l'œil nu par comparaison du trouble à apprécier avec des gammes étalons. Elle constitue, dans le cadre même de cette méthode un pas très sensible vers plus de précision, parce qu'elle présente à la lecture visuelle des suspensions très stables et homogènes. Elle est recommandable dans les cas où une bonne approximation suffit aux besoins de la clinique, quand on ne possède pas de photomètre.

2°. — *Dosage des Globulines*

Nous n'examinerons, selon le critère que nous avons choisi, parmi les méthodes de dosage des globulines, que celles qui offrent au praticien les avantages de la rapidité. Nous nous contenterons donc de mentionner :

— la méthode azotométrique, en rappelant les causes d'erreur qui découlent des coefficients de transformation,

— la méthode gravimétrique qui nous servira de référence,

— la méthode colorimétrique utilisant la réaction du biuret, trop imprécise.

Nous retiendrons, et ce sont à notre connaissance les seules techniques rapides, celles, très voisines d'Ujsaghi et de Dos Reis qui évaluent directement les globulines par la mesure photométrique du

trouble produit dans le liquide par le sulfate d'ammonium à demi-saturation. La discussion en a été faite : elles ont l'inconvénient majeur de fournir des suspensions à gros grains avec agglomération du floculat et tassement du précipité.

Techniques personnelles :

Nous proposerons deux procédés :

— une technique indirecte,

— une technique directe.

A) Technique indirecte : C'est un dosage par différence : on dose dans un premier temps les protides totaux, puis la sérum-albumine séparée des globulines par le sulfate d'ammonium à demi-saturation.

Mode opératoire :

Dans un tube à centrifuger, on met :

Sérum exactement mesuré	0cc2
Eau distillée	1cc8
Sol. aqu. saturée de Sulfate Am	2cc
Ether	2cc

On agite énergiquement pendant une minute le tube bouché avec un bouchon de caoutchouc et on centrifuge 3 à 4 minutes à 6000 tours. On a alors de haut en bas :

— une couche d'éther,

— une pastille de globuline,

— une liqueur limpide contenant la sérine diluée à 1/20e

On incline le tube : la pastille de globuline se détache des parois et suit l'inclinaison. On introduit une pipette en bouchant son extrémité avec le doigt pour empêcher l'éther d'y pénétrer, et quand on est dans le liquide, on prélève une quantité suffisante. On poursuit ainsi :

Solution de sérine	0 cc,2
Tampon acéto-acétique	0 cc,1
Sulfate Mg	1 cc,7

Ici le sulfate d'Am est inutile, la solution à étudier contenant pour 0 cc,2 le 1/10e de cc que l'on ajoutait dans la technique de dosage des protéines totales.

La lecture des résultats se fait sur la courbe étalon des P.T.

Cette technique nous a donné de bons résultats, comparée à la méthode pondérale que nous avons employée comme référence : à savoir la méthode selon Machebœuf et Wallide (18). On pourra en juger d'après le tableau que nous publions plus loin.

Il convient de signaler sa grande simplicité et rapidité des manipulations qu'elle demande, notamment la séparation facile et com-

plète de la globuline par un artifice que nous avons emprunté à Welschelbaum (7) et qui permet d'obtenir une solution de résine parfaitement limpide alors que la séparation par centrifugation — sans addition d'éther — même prolongée fournit un liquide souvent opalescent.

N.-B. — La solution de sulfate Am doit être saturée à froid dans l'eau distillée pour les raisons qui seront données en détail au chapitre suivant.

b) Dosage direct des globulines.

Les avantages — déjà décrits — de la solution saturée de sulfate Mg en néphélémétrie nous ont conduit à l'utiliser au dosage opacimétrique des globulines. Hasard heureux qui permettait de servir ce réactif à une double fin : le dosage des protéines totales et également le dosage des globulines, puisque le Sulfate Mg en solution saturée est précisément un réactif de séparation des globulines par précipitation.

Nous commencerons par étudier le réactif en regard des facteurs dont l'énumération suit :

1) Spécifité du réactif :

Il est indispensable de s'assurer que le Sulfate Mg à saturation est l'équivalent du Sulfate Am à demi saturation : réactif indiscuté des globulines puisqu'il est à la base de la définition même de ce groupe des constituants protidiques du sérum rassemblé sous ce terme générique .

Au préalable — et comme c'est notre réactif de préférence — précisons les conditions de son emploi. En conclusion à une étude publiée par Baudoin-Lewin et Hillon (19), ces auteurs préconisent :

a) l'emploi du Sulfate Am en solution aqueuse saturée à froid : le pH des solutions préparées à chaud se trouvent souvent au-dessous de 5, point critique où l'albumine commence également à précipiter. Le pH des solutions vieilles devra être vérifié.

b) de rejeter la filtration de liquide en expérience sur papier, lequel retient une certaine quantité d'albumine par adsorption et d'employer la centrifugation après séjour à l'étuve 37° pendant 4 heures pour obtenir des solutions de sérine limpide. Ici signalons que l'artifice de Weischelbaum remplace ces opérations et donne toute satisfaction.

Nous avons obéi dans nos essais à ces exigences.

Ceci dit, signalons que de nombreux chimistes, notamment Kaiser (20), se sont servis du Sulfate Mg avec les mêmes résultats que le Sulfate Am.

Nous avons néanmoins tenu à faire la preuve que notre réactif précipite toutes les globulines ; et ceci par rapport au sulfate Am. Les expériences suivantes le vérifient :

Premier point : à 1 cc. de sérum, on ajoute 19 cc. de solution saturée magnésienne. On agite, et après 24 heures, on filtre jusqu'à

obtention d'une liqueur limpide. Le filtrat — qu'il est bon de diluer au 10e par exemple — ne précipite pas par le réactif de référence.

Deuxième point : nous prenons du sérum débarrassé des globulines par le sulfate Am, on filtre : le filtrat ne précipite pas par le sulfate Mg.

2) Supériorité du sulfate Mg sur le sulfate Am en néphélémétrie :

Les suspensions obtenues sont opalines. très homogènes et stables. Après un certain temps : 1 - 2 heures, le précipité s'agglomère en petits flocons mais une simple agitation lui restitue son apparence première.

3) Influence du degré de saturation du sulfate Mg dans l'eau :

Le sulfate Mg doit être cristallisé, pur, et sa solution saturée préparée à froid aura une densité de 1.28 à 15°. A des densités inférieures la précipitation n'est plus quantitative.

Ainsi, 4 tubes contiennent 0 cc, 1 d'un même sérum
+ 2 cc, 9 de solutions magnésiennes de densités décroissantes, soit : 1. 28 1, 25 1, 20 1, 15.

La densité optique du trouble mesurée après une heure donne respectivement : 64, 2 64, 2 58, 6 54, 3.

4) Influence de la durée de contact :

La lecture doit être faite après une heure : au-dessous les D. O. d'un trouble donné sont un peu inférieures, au-dessus et jusqu'à 12 heures, elles demeurent constantes.

Technique arrêtée :

Dans un tube à hémolyse, on met, mesuré à la pipette de précision :

Sérum frais	0 cc, 1
Solution magnésienne	2 cc, 9

On agite fortement et on fait la lecture au photo-colorimètre de Bonnet-Maury, écran 15 avec rallonge.

Cette dilution, au 30e, a été choisie de façon à ce que les sérums normaux fournissent des troubles dont la concentration en particules suspendues demeure assez faible pour se prêter à un bon dosage opacimétrique (loi de Rayleigh).

Dans le cas de sérums pathologiques, de néphrose lipoïdique par exemple, dont la teneur élevée en globulines se traduirait par des D.O. supérieures à 85, opérer sur une dilution plus haute — au 60e par exemple — du sérum avec le réactif. On divisera par deux à ce moment les chiffres donnés par la courbe d'étalonnage.

Courbe d'étalonnage :

L'étalon à été un sérum dont le taux en globulines a été déterminé avec toutes les précautions voulues par la méthode gravimétrique selon Machebœuf (en substituant aux filtrations des centrifugations,

pour nous conformer aux recommandations de Baudouin-Lewin).

La courbe, construite à partir d'une dizaine de points satisfait à très peu près la loi de Beer-Lambert : en ordonnée sont inscrites les D.O. et en abcisse les résultats en grammes de globulines par litre de sérum (cf. la reproduction que nous en donnons). (1)

Confrontation avec la méthode de référence : la gravimétrie.

Ci-dessous un tableau de comparaison portant sur les sérums que nous avons étudié au point de vue des Protéines totales : Rappelons que les sérums 1 et 2 sont des sérums normaux, le 3 appartient à une néphrose, le 4 à une cirrhose du foie avec ascite, le 5 à un cancer gastrique.

Tubes	1	2	3	4	5
Gravimétrie	28,4	31,1	38,2	44,8	37
T. directe	29,4	32,1	40,6	48	39,1
T. indirecte	29,7	32,6	39,1	46,1	38

La concordance est aussi bonne que possible : les écarts atteignant au maximum 3 à 7% pour la technique néphélémétrique dite directe et 2 à 3% pour la technique dite indirecte. Celle-ci se caractérise par sa plus grande précision et c'est à elle, évidemment que vont nos préférences. Cependant la méthode directe, en raison de sa très grande simplicité et de sa rapidité, nous parait dans la pratique clinique également recommandable car elle fournit des résultats qui ne laissent pas d'être satisfaisants

(1) Voir graphique page 40.

CHAPITRE IV

CONCLUSION

En manière de conclusion, nous allons rappeler brièvement le très grand intérêt du dosage des protides et de leurs fractions dans les liquides biologiques.

La connaissance de la protéinémie globale est intéressante dans nombre d'états pathologiques (tuberculose, cancer, néphrose lipoïdique, cirrhose). Elle est depuis quelque temps essentielle pour les chirurgiens au point de conditionner l'opportunité des grandes terventions sur l'estomac, le foie, les reins.

Dans les liquides de ponction : ascitiques, pleuraux, d'hydartrose, le dosage des protéines est susceptible d'orienter efficacement le clinicien.

Encore plus riche d'enseignements est la valeur du quotient albumineux, qui constitue pour certaines affections un élément important du diagnostic : néphrose, cirrhose du foie avec ascite, œdème de carence où l'inversion du rapport est de règle.

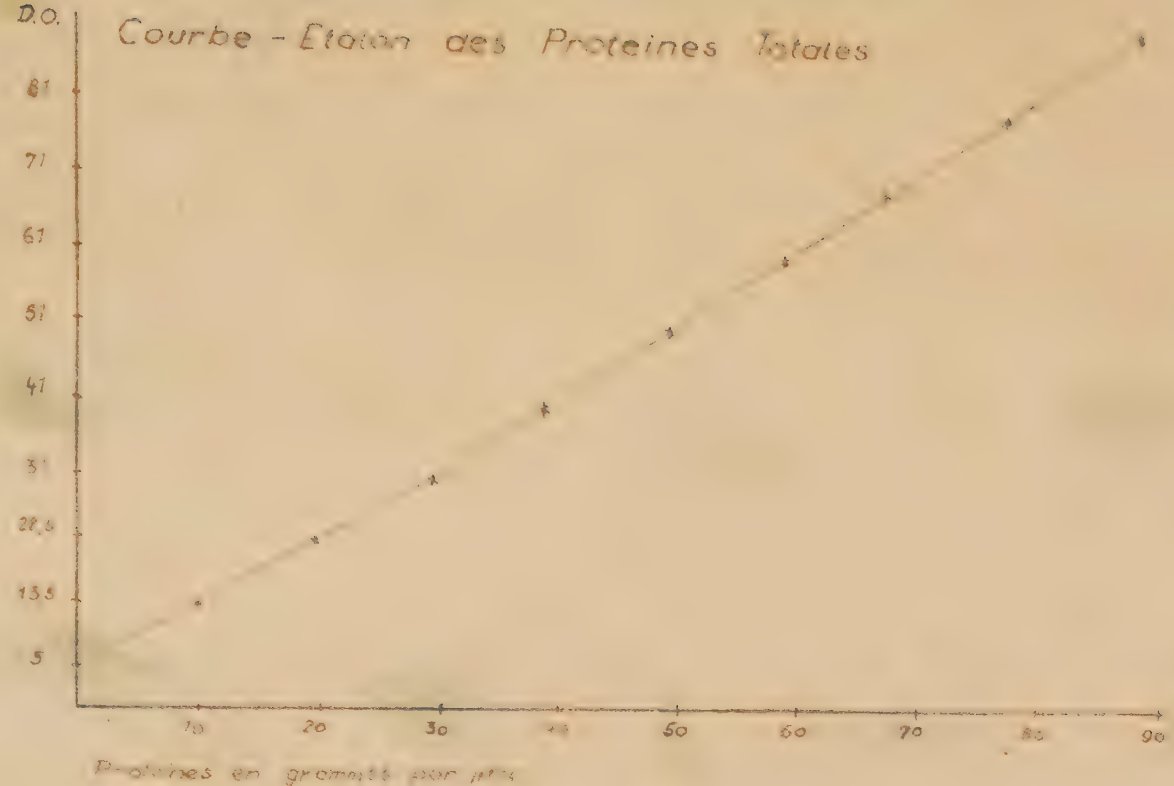
Dans la syphilis la connaissance de ce rapport peut permettre de suivre l'évolution de la maladie concurrement avec la sérologie et quelquefois indépendamment de celle-ci. Sézary et Martinet ont vu le chiffre des protéines rester constant avec une nette augmentation des globulines et le sang reprendre son équilibre normal sous l'influence du traitement, alors que les réactions spécifiques ne suivaient pas toujours la même courbe, chez les chimiorésistants par exemple.

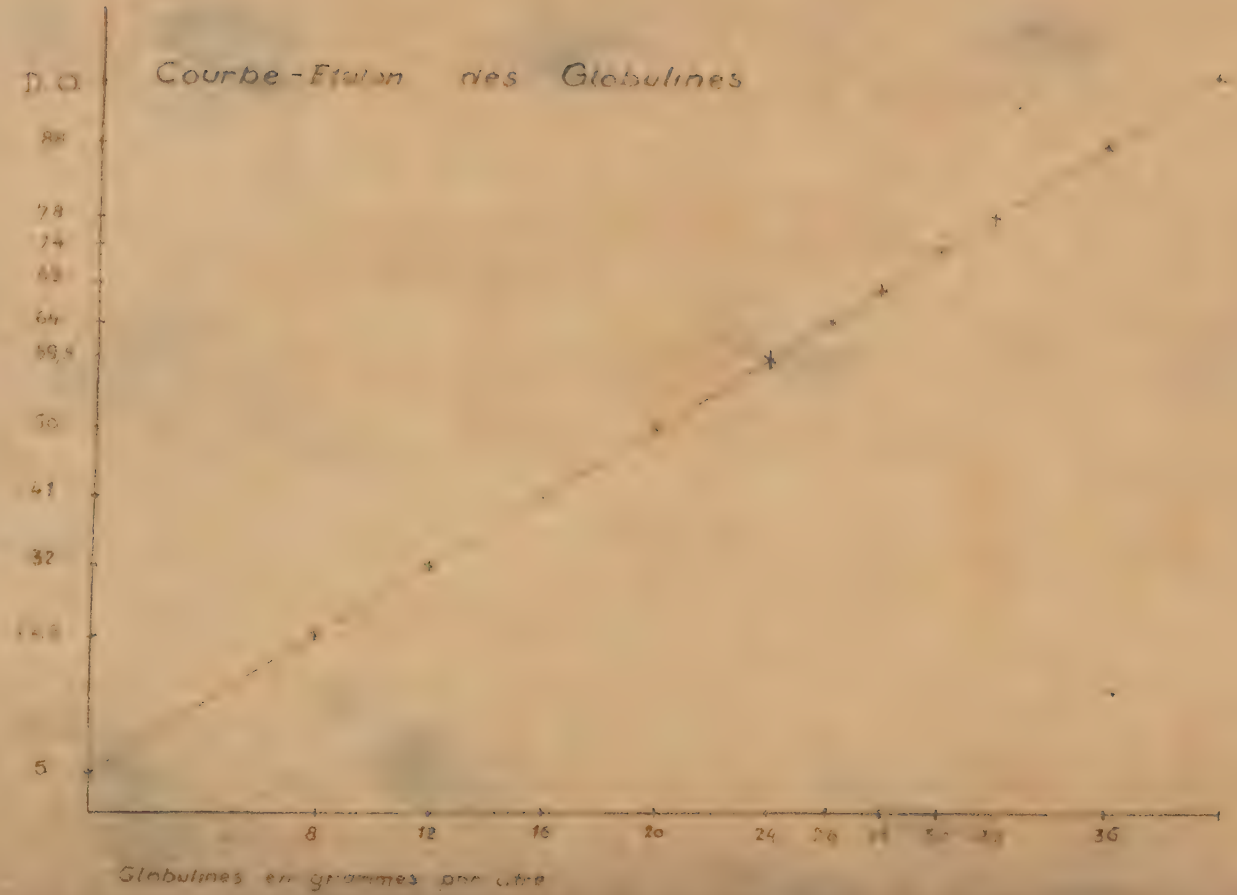
Nous n'avons dressé cet inventaire succint mais éloquent pour

ne déplorer que plus vivement que la difficulté et les longueurs des méthodes valables de dosage de protides et de leurs fractions les aient rendues aussi peu praticables et aussi peu pratiquées dans les laboratoires de biologie clinique.

A l'heure où ces techniques se multiplient avec des résultats, il faut l'avouer assez disparates et où, dans le même temps, les biochimistes souhaitent avec d'autant plus d'ardeur leur unification nous formulons quant à nous le vœu qu'un accord se réalise sur la nécessité de se référer dans tous les cas à la méthode pondérale, la seule rigoureuse dans le domaine de l'exactitude et l'expression non équivoque des résultats

Nous espérons nous en être rapprochés sensiblement dans la mise au point de notre technique néphélémétrique. Nous nous estimerons récompensés au-delà de nos efforts si, en mettant à la portée des praticiens une méthode satisfaisante sous le double rapport de la précision et de la simplicité, nous aurons contribué à l'application plus générale des indications du dosage des protéines et de leurs fractions.


D.O.
Courbe - Etalon des Proteines Totales
81
71
61
51
41
31
22,5
13,5
5
10
20
30
50
60
70
90
Protéines en grammes par litre


D.O.
Courbe - Fiwlon des Globulines
8
78
74
69
64
59,5
50
41
32
5
8
12
16
20
24
36
Globulines en grammes par litre

BIBLIOGRAPHIE

(1) *Ann. Bio. Clin. Mars-Avril 1948 pages 97-98.*
(2) *Ann. Bio. Clin. 1947, t. 5, p. 386.*
(3) *Bul. U. S. Army 1943 N° 71, p. 66.*
(4) *Jour. Bio. Chem. 1922 t. 51 p. 33.*
(5) *Jour. Bio. Chem. 1940 t. 133 p. 81.*
(6) *Ann. jour. Clin. path. 1946, 16, p. 40*
(7) *Ann. Bio. Clin. Janvier-Février 1948 p. 72.*
(8) *Journ. Bio. Chem. 1920 T. 41 p. 587.*
(9) *Bul. Soc. Chi. Bio 1930 T. 12 p. 533.*
(10) *Jour. Bio. Chem 1921 T. 49 p. 93.*
(11) *Bul. Soc. Chi Bio. 1921 p. 3.483.*
(12) *Thèse Doc. Médecine Paris 1923.*
(13) *Bio. Zeistresch. 307264, 1941 et Ann. Bio. Cli. Janvier-Février 1948 p. 18.*
(14) *Ann. Bio. Cli. Janvier-Février 1948 p. 19.*
(15) *Ann. Bio. Cli. Janvier-Février 1948 p. 38.*
(16) *Dognon in. techn. de lab. (Loiseleur) p. 205-206,*
(17) *Diagnostic Bio. Fissinger éd. 1946 p. 614.*
(18) *Diagnostic Bio. Fissinger éd. 1946 p. 618.*
(19) *Ann. Bio. Cli. Janvier-Février 1948 p. 30.*
(20) *Bul. Soc. Chi. Bio. 1930 T. 12 p. 253.*